

麹菌由来界面活性タンパク質 hydrophobin RoIAの 自己組織化機構の解明

著者	寺内 裕貴
号	56
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農博第1251号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00127960

てらうち ゆうき

氏 名 () 寺内 裕貴 ()

学 位 の 種 類 博士 (農学)

学 位 記 番 号 農博第 1251 号

学 位 授 与 年 月 日 令和 2 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項

研 究 科 , 専 攻 東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 生物産業創成科学専攻

論 文 題 目 麹菌由来界面活性タンパク質 hydrophobin RolA の自己組織化機構の解明

博士論文審査委員 (主査) 教授 阿部 敬悦

教授 原田 昌彦

准教授 新谷 尚弘

准教授 二井 勇人

教授 五味 勝也

論文内容要旨

麹菌由来界面活性タンパク質 **hydrophobin RoIA** の
自己組織化機構の解明

東北大学大学院農学研究科

生物産業創成科学専攻

寺内 裕貴

指導教員

阿部 敬悦 教授

序論

麹菌 *Aspergillus oryzae* はその固体高分子分解能力の高さから日本国内で発酵産業に長らく利用されてきた糸状菌である⁽¹⁾。我々は、*A. oryzae* が生分解性ポリエステル PBSA を資化する際に、PBSA 分解酵素 cutinase CutL1 とともに、界面活性タンパク質 hydrophobin RolA を生産することを見出した^(2, 3)。RolA は PBSA のような固体表面に吸着、表面を被覆し、その後 CutL1 を固体表面上にリクルートすることで、CutL1 による PBSA 分解を促進する⁽³⁾。hydrophobin は糸状菌に特異的な低分子量かつ分泌性の両親媒性タンパク質であり、Cys が 8 つ保存されている^(4, 5)。糸状菌の生態において、Hydrophobin は気中菌糸の形成や分生子の分散性、固体表面への吸着、吸着した固体表面の湿潤性の逆転、菌糸や分生子の細胞壁表面での疎水性被膜の形成、動植物感染時の宿主免疫機構による認識の回避などの多岐にわたる役割を担うことが知られている^(6, 7)。hydrophobin はアミノ酸配列や hydropathy から主に 2 つの Class に分けられ、RolA はそのうちより疎水度が高く、固体表面上で β -amyloid 様の自己組織化棒状構造 (rodlet) を形成する Class I に属する^(4, 5, 8)。また、rodlet の形成には hydrophobin の Cys3-Cys4 間および Cys7-Cys8 間のアミノ酸配列 (Cys3-4 loop, Cys7-Cys8 loop) が関与していることが示唆されている^(9, 10)。

界面活性タンパク質が足場となって固体高分子分解酵素をリクルートするという分子間相互作用は、我々が新奇に発見した固体高分子分解メカニズムである^(3, 11)。この相互作用が RolA の N 末端側正電荷アミノ酸残基と CutL1 の分子表面負電荷アミノ酸残基とのイオンの相互作用であることを明らかにしてきたが^(12, 13)、一方で、RolA の rodlet の形成が CutL1 との相互作用に必須であるかどうかは明らかになっていない。この rodlet 構造が CutL1 との相互作用に必要な否かを調べるためには、まず RolA の rodlet の形成機構を分析し、制御する必要がある。

そこで本博士論文研究では、界面における hydrophobin RolA の rodlet の形成機構を分析し、明らかにすることとした。

第一章 RolA の固液界面における吸着キネティクスと自己組織化機構の研究

糸状菌の生態において、RolA は液中から固液界面へと吸着していることが考えられたため、固液界面における RolA の吸着キネティクスと自己組織化機構について調べた。

固液界面における吸着キネティクス解析は、我々が RolA-CutL1 間の相互作用解析にも用いた水晶発振子マイクロバランス法 (QCM; Quartz crystal microbalance) を用いることにしたが、様々な固液界面に対する RolA の吸着キネティクスを解析するためには、QCM に用いるセンサー表面 (金) の性質 (疎水性、荷電性) を制御することが不可欠だった。そこで、センサー表面上に様々な官能基を有した自己組織化単分子膜 (SAM; Self-assembled monolayer) を形成させることで、センサー表面の性質を制御した。SAM 化した表面は静止接触角と原子間力顕微鏡 (AFM;

Atomic force microscopy) で評価した(Fig.1, Table.1)。

次に、QCM を用いて、様々な pH, センサー表面性質における RolA の固液界面に対する吸着キネティクスを評価した (Fig.2A, 3A, 4A, Table 2, 3, 4) 。その結果、RolA の吸着キネティクスに対するセンサー表面の性質の影響は小さく、液中の pH の影響がより支配的に働き、RolA の Cys3-Cys4 loop および Cys7-Cys8 loop の予測等電点 (Cys3-4 loop; pI = 3.96, Cys7-Cys8 loop; pI = 3.91) に近いほど親和性が上昇した。このことから、RolA は固液界面に対し主に疎水的相互作用で吸着していることが示唆された (Fig.5A) 。

次に、RolA で被覆したセンサー表面の静止接触角を測定した後、AFM でセンサー表面を観察し、センサー表面に形成された RolA の構造を評価した。静止接触角の結果から、センサー表面に RolA が吸着することでセンサー表面の湿潤性が改質されている表面と改質されていない表面も存在した (Table 1, 2, 3, 4)。これは、静止接触角による測定がマクロな測定系であり、接触角がセンサー表面上を RolA が覆っている部分だけでなく、RolA が吸着せずセンサー表面上の SAM が露出している部分の影響も受けてしまっているためだと考えられる。AFM 観察の結果からも、RolA はセンサー表面を完全に覆えていないことが示唆された。吸着量が 6 ng の場合は、いずれのセンサー表面の性質においても球状構造が形成されたが、吸着量が 30 ng の場合、疎水性表面では pH4 でセンサー表面の凹凸に沿った網目状の構造が、pH7 で棒状構造が形成されたのに対し、正または負の荷電性表面には短い棒状構造が形成された(Fig.2B, 3B, 4B)。このことから、RolA の自己組織化構造の形成は固体表面への吸着量が一定量に達しないと形成されないこと、RolA の自己組織化構造の形状は固体表面の凹凸に影響を受けること、自己組織化構造の形は固体表面の性質の影響を強く受けることが示唆された。また、疎水性表面では大きな構造ができたのに対し、荷電性表面では小さな構造しか形成されず、固体表面の荷電性による自己組織化構造形成の阻害を受けていると考えられたことから、rodlet の形成機構には、RolA 中の荷電性アミノ酸が関与していることが示唆された (Fig. 5B,C)。

第二章 RolA の気液界面における自己組織化過程および機構の研究

第一章では固液界面における吸着キネティクスと自己組織化構造形成機構を調べたが、使用した QCM 電極固体表面の凹凸が RolA の自己組織化構造形成に影響を与えていることが示唆された。QCM によるアプローチでは電極固体表面上の凹凸を小さくすることが難しいことから、別の解析方法として、界面活性物質の膜の性質解析によく用いられる気液界面膜 (L-膜; Langmuir 膜) 形成を用いた解析を行い、より詳細な rodlet 形成過程・機構の解析を行った (Fig.6)。L-膜形成法とは、トラフ (Trough) と呼ばれる水槽に緩衝液を入れ、緩衝液と空気の界面 (気液界面) に界面活性物質を展開し、気液界面を圧縮することで界面活性物質の膜を気液界面上に形成しつつ、形成過程を膜の表面圧から解析する方法である。また、作製した L-膜を SiO₂ のような平滑

な表面に転写することで、形成された膜の構造の観察も行うことができる (Fig.6)。

まず、pH5 条件下において RolA L-膜形成と、それに伴う RolA L-膜の表面膜圧の測定を行い、RolA の rodlet 形成過程の解析を行った。その結果、RolA は気体膜から液体膜、そして固体膜への相転移を経てから、rodlet を形成していることが示唆された (Fig.7, Table 5)。

次に、作製した RolA L-膜を親水性または疎水性に改質した SiO₂ 基板に転写し、RolA 膜の静止接触角の測定と、RolA 膜の構造を AFM で観察した。静止接触角の結果から、RolA 膜が相転移し自己組織化構造が形成されていくに従い、SiO₂ 基板の湿潤性がより改質されていくことが示唆された (Table 6)。また、AFM 観察の結果から、親水性 SiO₂ 基板に転写した RolA L-膜は RolA 単分子膜から徐々に rodlet が形成されていく様子が観察されたのに対し、疎水性 SiO₂ 基板に転写した RolA L-膜は単分子膜から親水性 SiO₂ 基板で観察された rodlet よりも大きな構造が形成されていくのが観察された (Fig.8, 9)。このことから、RolA L-膜は気液界面に形成される際、気体側には RolA の rodlet の膜が形成されるが、その下の液体側には RolA のミセルと考えられる構造の膜が形成される、異なる構造の膜が重なる複層構造の膜であることが示唆された (Fig.10)。

さらに、RolA L-膜の rodlet 形成機構を調べるため、各 pH 条件下で RolA L-膜を作製し、それに伴う RolA L-膜の表面膜圧の測定を行った。その結果、pH5, 6 条件下では rodlet が形成されたが、pH7 以上 では rodlet が形成されなかった (Fig.11)。この結果から、RolA の rodlet 形成には RolA アミノ酸配列中の側鎖の電離が関与していることが示唆された。

最後に、RolA の rodlet 形成にイオンの相互作用が関与しているのか調べるため、pH5、塩存在下で RolA L-膜を作製し、それに伴う RolA L-膜の表面膜圧の測定を行った。その結果、RolA の rodlet 形成は塩の存在の有無に影響を受けなかった (Fig.12)。この結果から、pH5 における RolA の rodlet 形成機構にイオンの相互作用が関与していないことが示唆された。

総合考察

A. oryzae により生産される界面活性タンパク質 hydrophobin RolA の自己組織化機構を調べるため、固液界面および気液界面に対する RolA の rodlet の形成および観察を行った。固液界面に対して、吸着キネティクスは pH 条件に影響を受け、pH7 では疎水性表面以外では親和性が低く、吸着量も 30 ng まで達することはなかった。また、rodlet 形成の有無は RolA の吸着量が一定より多くなることが重要であることが示唆された。気液界面でも、RolA 一分子当たりの専有面積が小さくなる、つまり気液界面における RolA の密度が上昇することで rodlet が形成された。このことから、RolA の自己組織化には RolA の単位面積または単位体積当たりの RolA 量が重要であることが示唆された。また、固液界面と気液界面での rodlet の形成結果から、RolA 中のアミノ酸の側鎖の電離状況が rodlet 形成機構に重要であることが示唆された。また、塩存在下でも rodlet が形成されたことから、rodlet 形成にイオンの相互作用が関わっていないことが示唆された。これらのことか

ら、自己組織化構造は疎水的相互作用または水素結合によって形成されているのではないかと考えられる。

また、QCM 電極疎水性 SAM 化固体表面に形成された RolA の rodlet 膜と、気液界面に形成された RolA rodlet 膜の構造が大きく異なっていた。この原因は、2 つ考えられる。1 つは、表面の凹凸の差の影響があげられる。疎水性固体表面の凹凸は ± 20 nm あり、気液界面に形成された rodlet の高さや幅を大きく超えている。もう 1 つは、界面エネルギーの差が挙げられる。疎水性固体表面の接触角は約 90° であり、固液界面と気液界面では界面エネルギーに大きな差があると考えられる。RolA は rodlet 形成時に界面エネルギーを消費して構造を形成している可能性が考えられる。これら考えられる原因のうち一方、あるいは両者が関わった結果、構造の違いにつながった可能性が考えられる。

本研究の結果から、RolA の自己組織化構造形成について、新たな知見が得られた。しかし、自己組織化構造形成機構については、少なくともイオンの相互作用が関与していないことが明らかになったのみであり、詳細については明らかにすることができなかった。今回の結果から、RolA 分子中のアミノ酸側鎖の電離が rodlet 形成に関与していることが明らかになったため、RolA の荷電性アミノ酸の変異体を用いた RolA L-膜の作製すれば、rodlet 形成機構の詳細に迫れると考えられる。また、我々の以前の研究から、RolA の固体表面への親和性が Cys7-Cys8 loop 中の疎水性アミノ酸を変異させると下がること分かっているため⁽¹⁴⁾、この変異体を用いた RolA L-膜の作製から、rodlet 形成機構の詳細に迫ることができると考えられる。また、rodlet 形成には、イオンの相互作用のほかにも、疎水的相互作用や水素結合等も考えられるため、それらを阻害した場合の RolA L-膜作製をすることも rodlet 形成機構の解明につながると考えられる。

また、rodlet 形成機構の研究とは別になるが、本研究により RolA rodlet 膜やその前段階の RolA 単分子膜の作製・制御が行えるようになった。このことから、RolA-CutL1 相互作用の詳細に迫ることが可能になった。今後は、rodlet 形成機構の研究を行いつつ、RolA-CutL1 相互作用の詳細の解明も行っていきたいと考えている。

原著論文

Yuki Terauchi, Takumi Tanaka, Masaya Mitsuishi, Hiroshi Yabu, Akira Yoshimi, Kei Nantani and Keietsu Abe (2019)

Analysis of the self-assembly process of *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA by Langmuir–Blodgett method.

Bioscience Biotechnology and Biochemistry, DOI: 10.1080/09168451.2019.1706443.

Yuki Terauchi*, Megumi Nagayama*, Takumi Tanaka, Hiroki Tanabe, Akira Yoshimi, Kei Nanatani, Hiroshi Yabu, Toshihiko Arita, Takeshi Higuchi, and Keietsu Abe

* These authors contributed equally to this work

Adsorption kinetics and self-assembled structures of RolA on hydrophobic and charged solid surfaces

執筆中

参考文献

1. Machida M, Yamada O, Gomi K. 2008. Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. *DNA Res* 15:173-83.
2. Maeda H, Yamagata Y, Abe K, Hasegawa F, Machida M, Ishioka R, Gomi K, Nakajima T. 2005. Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:778-88.
3. Takahashi T, Maeda H, Yoneda S, Ohtaki S, Yamagata Y, Hasegawa F, Gomi K, Nakajima T, Abe K. 2005. The fungal hydrophobin RolA recruits polyesterase and laterally moves on hydrophobic surfaces. *Mol Microbiol* 57:1780-96.
4. Wessels J, De Vries O, Asgeirsdottir SA, Schuren F. 1991. Hydrophobin Genes Involved in Formation of Aerial Hyphae and Fruit Bodies in *Schizophyllum*. *Plant Cell* 3:793-799.
5. Russo PS, Blum FD, Ipsen JD, Abulhajj YJ, Miller WG. 1982. The Surface-Activity of the Phytotoxin Cerato-Ulmin. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 60:1414-1422.
6. Wosten HA, van Wetter MA, Lugones LG, van der Mei HC, Busscher HJ, Wessels JG. 1999. How a fungus escapes the water to grow into the air. *Curr Biol* 9:85-8.

7. Aïmaniananda V, Bayry J, Bozza S, Kniemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, Clavaud C, Paris S, Brakhage AA, Kaveri SV, Romani L, Latge JP. 2009. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* 460:1117-21.
8. Wosten HA, Schuren FH, Wessels JG. 1994. Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipathic protein membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *EMBO J* 13:5848-54.
9. Kwan AH, Winefield RD, Sunde M, Matthews JM, Haverkamp RG, Templeton MD, Mackay JP. 2006. Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3621-6.
10. Niu B, Gong Y, Gao X, Xu H, Qiao M, Li W. 2014. The functional role of Cys3-Cys4 loop in hydrophobin HGFI. *Amino Acids* 46:2615-25.
11. Ohtaki S, Maeda H, Takahashi T, Yamagata Y, Hasegawa F, Gomi K, Nakajima T, Abe K. 2006. Novel hydrophobic surface binding protein, HsbA, produced by *Aspergillus oryzae*. *Appl Environ Microbiol* 72:2407-13.
12. Takahashi T, Tanaka T, Tsushima Y, Muragaki K, Uehara K, Takeuchi S, Maeda H, Yamagata Y, Nakayama M, Yoshimi A, Abe K. 2015. Ionic interaction of positive amino acid residues of fungal hydrophobin RolA with acidic amino acid residues of cutinase CutL1. *Mol Microbiol* 96:14-27.
13. Terauchi Y, Kim YK, Tanaka T, Nanatani K, Takahashi T, Abe K. 2017. Asp30 of *Aspergillus oryzae* cutinase CutL1 is involved in the ionic interaction with fungal hydrophobin RolA. *Biosci Biotechnol Biochem* 81:1363-1368.
14. Tanaka T, Tanabe H, Uehara K, Takahashi T, Abe K. 2014. Involvement of hydrophobic amino acid residues in C7-C8 loop of *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA in hydrophobic interaction between RolA and a polyester. *Biosci Biotechnol Biochem* 78:1693-9.

Table 1. Thiol reagents for SAM modification and water contact angles of the surfaces of SAM-modified QCM electrodes.

SAM	Structural formula	Water contact angle (°)
Gold	Au	85.5 ± 3.4
1-undecanethiol (1-UD)	<chem>CCCCCCCCCCCCS</chem>	100.1 ± 2.0
11-amino-1-undecanethiol (11-AUD)	<chem>CCCCCCCCCCCCNS</chem>	34.9 ± 0.3
10-carboxy-1-decanethiol (10-CUD)	<chem>CCCCCCCCCCC(=O)OS</chem>	42.5 ± 4.7

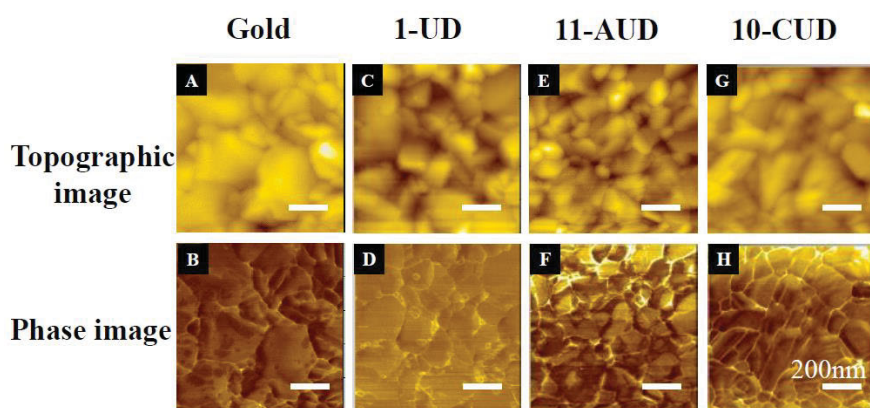


Fig. 1. AFM images of the surface of QCM electrodes.

(A)(B) non-modified gold electrode; (C)(D) 1-undecanethiol (1-UD) modified electrode; (E)(F) 11-amino-1-undecanethiol (11-AUD) modified electrode; (G)(H) 10-carboxy-1-decanethiol (10-CUD) modified electrode. Topographic images (A,C,E,G) and phase images (B,D,F,H) are shown. Scale bar = 200 nm.

Table 2. Summary of the interaction between RolA and 1-UD-modified surfaces, water contact angle of surfaces with adsorbed RolA, and shape of self-assembled RolA structures.

pH	K_D (nM)*	B_{\max} (ng)*	Water contact angle (°)		Shape of RolA structures	
			RolA 6 ng	RolA 30 ng	RolA 6 ng	RolA 30 ng
4	N.C.	N.C.	99.6±2.0	94.5±1.9	Sphere	Mesh
7	135.0±35.8	9.1±1.9	84.4±6.1	79.2±4.0	Sphere	Rod
10	200.7±49.1	4.6±2.6	96.2±1.7	N/A	Sphere	N/A

*Values were calculated from the first plateau.

N.C., not calculable; N/A, not assessed.

Table 3. Summary of the interaction between RolA and 10-CUD-modified surfaces, water contact angle of surfaces with adsorbed RolA, and shape of self-assembled RolA structures.

pH	K_D (nM)*	B_{\max} (ng)*	Water contact angle (°)		Shape of RolA structures	
			RolA 6 ng	RolA 30 ng	RolA 6 ng	RolA 30 ng
4	71.3±0.6	4.0±1.2	59.2±3.8	51.9±2.4	Sphere	Short rod
7	187.3±69.0	2.4±1.2	60.5±1.3	N/A	Sphere	N/A
10	396.5± 31.8	1.0±0.0	55.8±3.2	N/A	Sphere	N/A

*Values were calculated from the first plateau.

N.C., not calculable; N/A, not assessed.

Table 4. Summary of the interaction between RolA and 11-AUD-modified surfaces, water contact angle of surfaces with adsorbed RolA, and shape of self-assembled RolA structures.

pH	K_D (nM)*	B_{\max} (ng)*	Water contact angle (°)		Shape of RolA structures	
			RolA 6 ng	RolA 30 ng	RolA 6 ng	RolA 30 ng
4	N.C.	N.C.	90.4±2.5	62.3±2.9	Sphere	Short rod
7	49.4±0.3	1.7±0.2	51.0±0.8	N/A	Sphere	N/A
10	N.C.	N.C.	62.3±2.2	N/A	Sphere	N/A

*Values were calculated from the first plateau.

N.C., not calculable; N/A, not assessed.

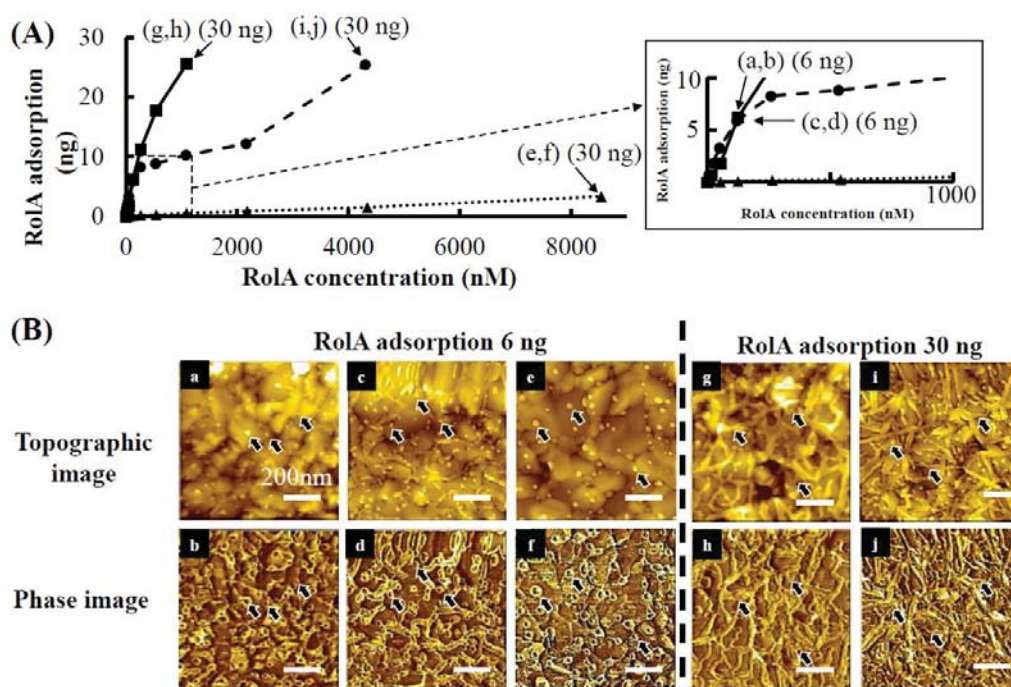


Fig. 2. QCM monitoring of interaction between RolA and 1-undecanethiol surface, and AFM images of the RolA-adsorbed surfaces.

(A) Adsorption amount of RolA on 1-UD-modified electrode in response to addition of RolA. Solid line and square : pH4. Dashed line and circle : pH7. Dotted line and triangle : pH10. The area where the RolA concentration under 1,000 nM is shown in an enlarged view of the inset. The arrows and lower case letters in the graph indicate the adsorbed amounts of RolA to the electrodes of which surfaces were observed with AFM.

(B) The AFM images of the surface topographic and phase. (a)(b) the surface on which 6 ng of RolA adsorbed under the condition of pH 4; (c)(d) the surface on which 6 ng of RolA adsorbed under the condition of pH 7; (e)(f) the surface on which 6 ng of RolA adsorbed under the condition of pH 10; (g)(h) the surface on which 30 ng of RolA adsorbed at pH 4; (i)(j) the surface on which 30 ng of RolA adsorbed under at pH 7. For each AFM image, the structures formed by RolA are indicated by arrows. Image size is $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$. Scale bar = 200 nm.

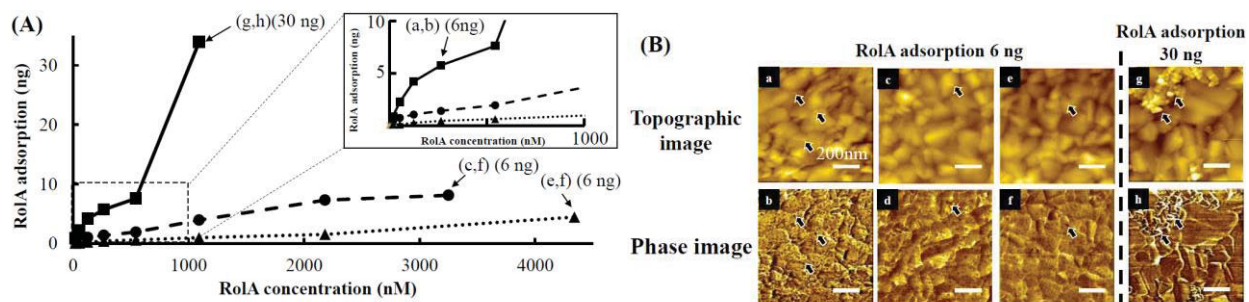


Fig. 3. QCM monitoring of interaction between RolA and 10-carboxy-1-decanethiol surface, and AFM images of the RolA-adsorbed surfaces.

(A) Adsorption amount of RolA on 10-CUD-modified electrode in response to addition of RolA. *Solid line and square: pH4. Dashed line and circle: pH7. Dotted line and triangle: pH10.* The area where the RolA concentration under 1,000 nM is shown in an enlarged view of the inset. The arrows and lower case letters in the graph indicate the adsorbed amounts of RolA to the electrodes of which surfaces were observed with AFM. (B) The AFM images of the surface topographic and phase. (a)(b) the surface on which 6 ng of RolA adsorbed under the condition of pH 4; (c)(d) the surface on which 6 ng of RolA adsorbed under the condition of pH 7; (e)(f) the surface on which 6 ng of RolA adsorbed under the condition of pH 10; (g)(h) the surface on which 30 ng of RolA adsorbed at pH 4. For each AFM image, the structures formed by RolA are indicated by arrows. Image size is $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$. Scale bar = 200 nm.

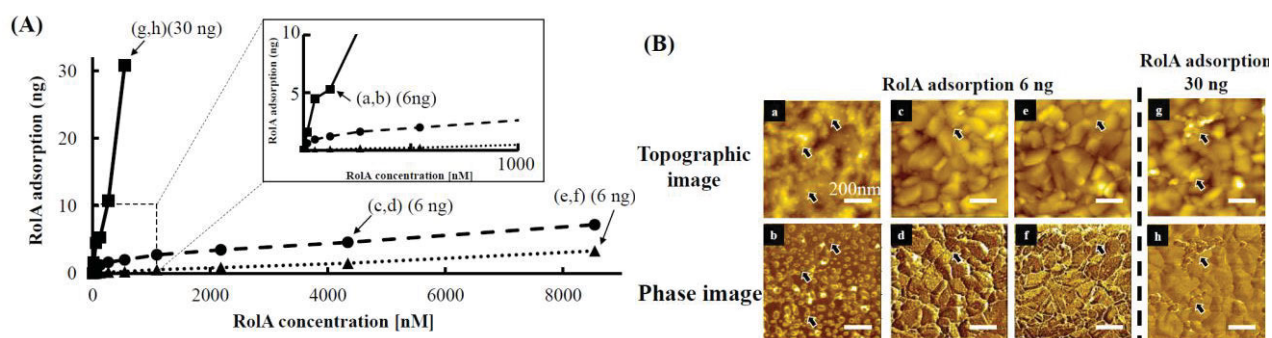


Fig. 4. QCM monitoring of interaction between RolA and 11-amino-1-undecanethiol SAM surface, and AFM images of the RolA-adsorbed surfaces.

(A) Adsorption amount of RolA on 11-AUD-modified electrode in response to addition of RolA. *Solid line and square: pH4. Dashed line and circle: pH7. Dotted line and triangle: pH10.* The area where the RolA concentration under 1,000 nM is shown in an enlarged view of the inset. The arrows and lower case letters in the graph indicate the adsorbed amounts of RolA to the electrodes of which surfaces were observed with AFM.

(B) The AFM images of the surface topographic and phase. (a)(b) the surface on which 6 ng of RolA adsorbed under the condition of pH 4; (c)(d) the surface on which 6 ng of RolA adsorbed under the condition of pH 7; (e)(f) the surface on which 6 ng of RolA adsorbed under the condition of pH 10; (g)(h) the surface on which 30 ng of RolA adsorbed at pH 4. For each AFM image, the structures formed by RolA are indicated by arrows. Image size is $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$. Scale bar = 200 nm.

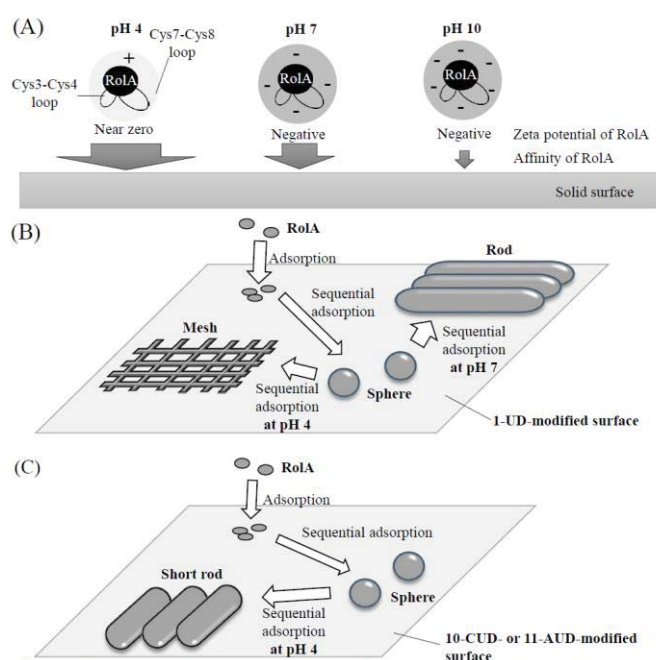


Fig. 5. Schematic models of adsorption and self-assembly of RolA on various solid surfaces.

(A) The schematic model of interaction between RolA and 1-UD / 10-CUD / 10-AUD-modified solid surfaces under various pH conditions. At pH 4, zeta potential of RolA is near zero and RolA showed high affinity to the three solid surfaces (1-UD / 10-CUD / 10-AUD-modified surfaces). At pH 7, zeta potential of RolA is negative and RolA showed lower affinity to three solid surfaces than at pH 4. At pH 10, zeta potential of RolA is more negative than at pH 7 and RolA showed lower affinity to three solid surfaces than at pH4 and pH 7. (B) The schematic model of adsorption and self-assembly of RolA on the 1-UD-modified surface under various pH conditions. At pH 4, 7 and 10, First, RolA molecules (small gray spheres) adsorb on the surface. As the amount of RolA adsorbed on the surface is increased, RolA forms the spherical structures (big gray spheres). As the amount of RolA adsorbed on the surface is further increased, RolA forms the mesh-like structures (gray mesh) at pH 4 and the rod-like structures (gray rods) at pH 7. At pH 10, the amount of RolA adsorbed on the surface is less than at pH 4 and 7, and RolA forms only the spherical structures. (C) The schematic model of adsorption and self-assembly of RolA on the 10-CUD or 11-AUD-modified surface under various pH conditions. First, RolA molecules (small gray spheres) adsorb on the surfaces. As the amount of RolA adsorbed on the surfaces is increased, RolA forms the spherical structures (big gray spheres). As the amount of RolA adsorbed on the surfaces is further increased, RolA forms the short rod-like structures (gray rods) at pH 4. At pH 10, the amount of RolA adsorbed on the surface is less than at pH 4 and 7, and RolA forms only the spherical structures.

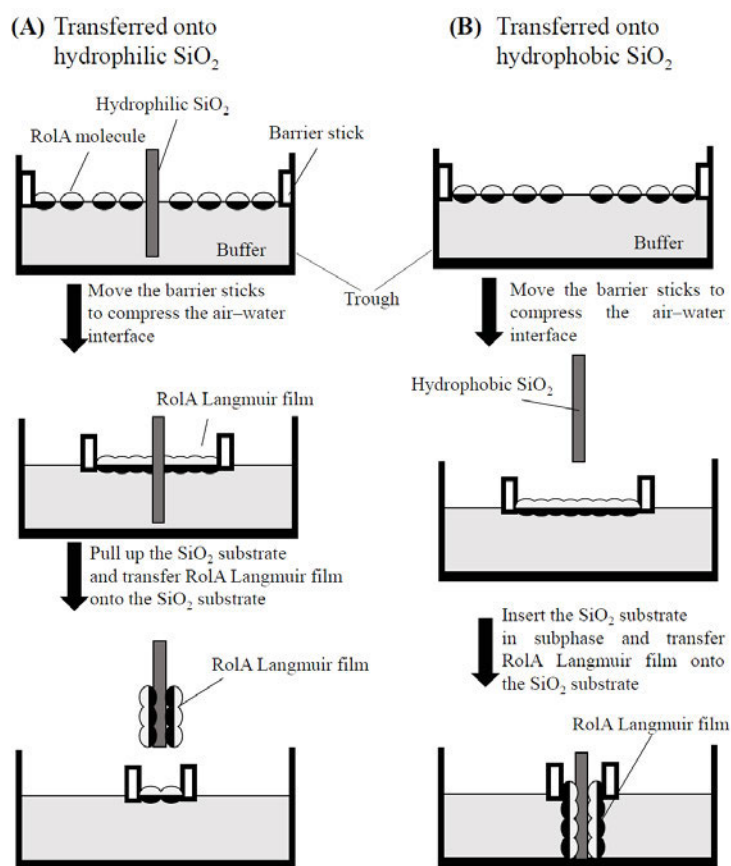


Fig 6. Model for formation and transfer of the RolA Langmuir film onto (a) the hydrophilic SiO₂ and (b) the hydrophobic SiO₂.

After a 100- μ L aliquot of RolA solution (0.40 mg/mL) was spread on the buffer surface, the barrier sticks were moved to compress the air–water interface to form the RolA Langmuir film. The RolA Langmuir film was then transferred onto the SiO₂ substrate (A) by slowly pulling up the SiO₂ substrate previously immersed in the buffer, or (B) by slowly and vertically inserting the SiO₂ substrate into the buffer.

Table 5. Langmuir film characteristics of RolA at pH 5.

Pressure point of π -A isotherm of RolA	π^* (mN/m)	C_s^{-1**} (mN/m)
Transition pressure point 1 (π_{tr1})	4.83 ± 0.10	17.37 ± 0.47
Transition pressure point 2 (π_{tr2})	9.78 ± 0.60	17.81 ± 0.35
Self-assembly pressure point (π_{trs})	13.17 ± 0.50	-4.94 ± 1.86
Collapse pressure point (π_c)	34.25 ± 1.75	47.20 ± 4.97

* π is the surface pressure of the RolA Langmuir film.

** C_s^{-1} was calculated from π -A isotherm plots using equation (1).

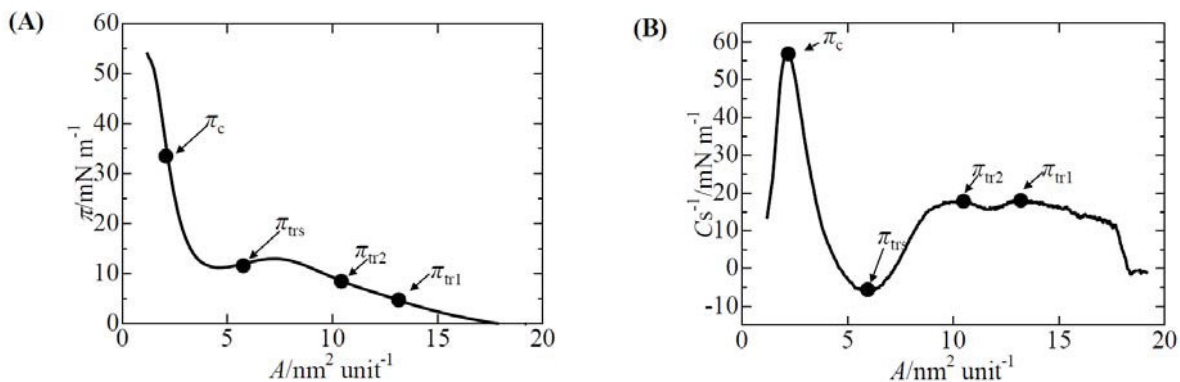


Fig 7. Isotherm profiles for RolA Langmuir film.

(A) Surface pressure (π)-area that a RolA molecule occupies on the liquid surface (A) isotherm of RolA at 20°C; 10-mM sodium acetate buffer, pH 5. (B) Compression moduli (C_s^{-1})- A isotherm of RolA at 20°C; 10-mM sodium acetate buffer, pH 5. Compression moduli (C_s^{-1}) were calculated from the π - A isotherm. π_{tr1} , π_{tr2} , π_{tr3} , and π_c shown on the isotherms represent transition pressure point 1, transition pressure point 2, self-assembly pressure point, and collapse point in Table 1, respectively.

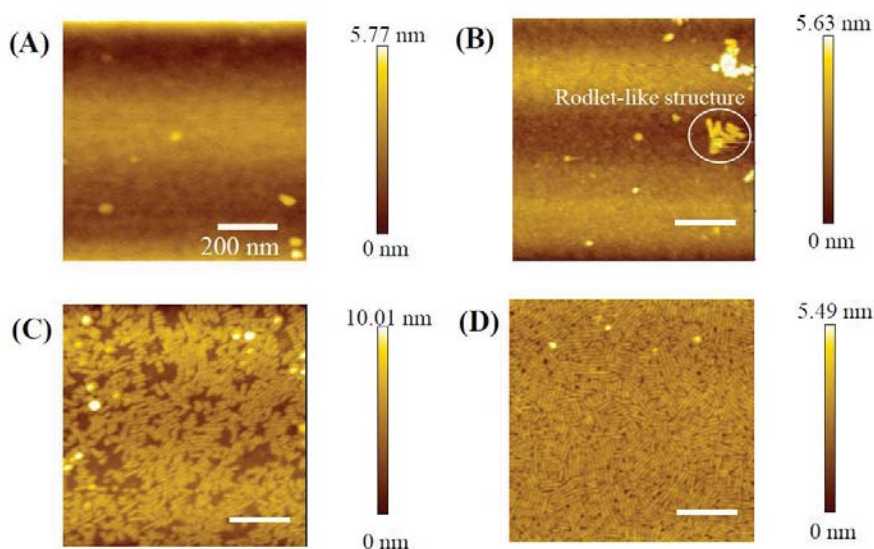


Fig 8. Atomic force microscopy topography images and height profiles of RolA Langmuir films on hydrophilic SiO_2 substrates.

(A) RolA Langmuir film transferred onto the SiO_2 substrate when the surface pressure was π_{tr1} . (B) RolA Langmuir film transferred onto the SiO_2 substrate when the surface pressure was π_{tr2} . (C) RolA Langmuir film transferred onto the SiO_2 substrate when the surface pressure was π_{tr3} . (D) RolA Langmuir film transferred onto the SiO_2 substrate when the surface pressure was π_c . Image size is $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$. Scale bars = 200 nm.

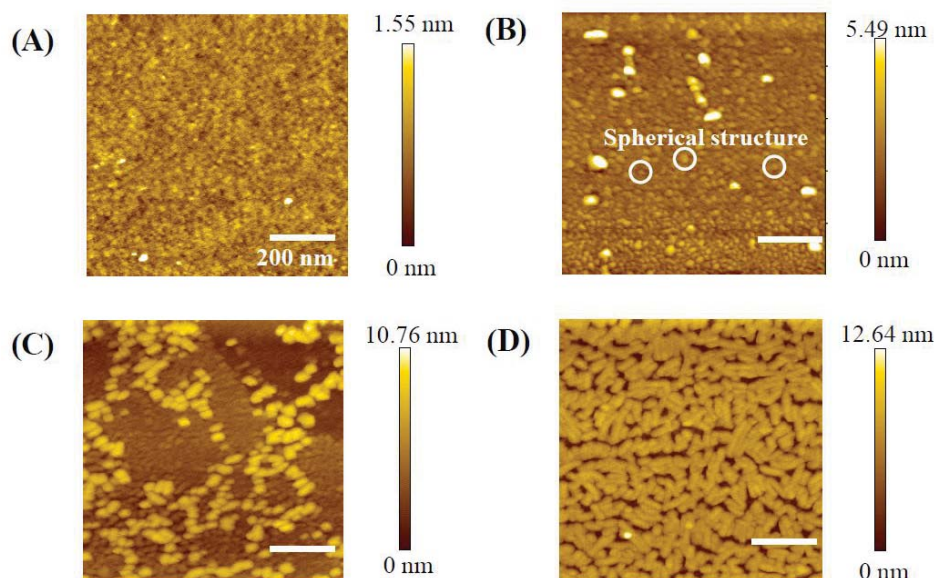


Fig 9. Atomic force microscopy topography images and height profiles of RolA Langmuir films on hydrophobic SiO₂ substrates.

(A) RolA Langmuir film transferred onto the SiO₂ substrate when the surface pressure was π_{tr1} . (B) RolA Langmuir film transferred onto the SiO₂ substrate when the surface pressure was π_{tr2} . (C) RolA Langmuir film transferred onto the SiO₂ substrate when the surface pressure was π_{trs} . (D) RolA Langmuir film transferred onto the SiO₂ substrate when the surface pressure was π_c . Image size is $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$. Scale bars = 200 nm.

Table 6. Water contact angle of RolA Langmuir films and SiO₂ substrates.

Substrate	Without RolA	Water contact angle of RolA Langmuir films at each surface pressure			
		π_{tr1}^*	π_{tr2}^*	π_{trs}^*	π_c^*
Hydrophilic SiO ₂	<5°	$19.2 \pm 0.7^\circ$	$31.4 \pm 2.0^\circ$	$31.3 \pm 1.1^\circ$	$66.6 \pm 1.0^\circ$
Hydrophobic SiO ₂	$94.7 \pm 0.3^\circ$	$82.9 \pm 3.7^\circ$	$75.5 \pm 5.8^\circ$	$74.1 \pm 0.6^\circ$	$57.3 \pm 1.2^\circ$

* $\pi_{tr1\sim2}$, π_{trs} and π_c are the transition pressure points 1~2, the self-assembly pressure point and the collapse pressure point, respectively.

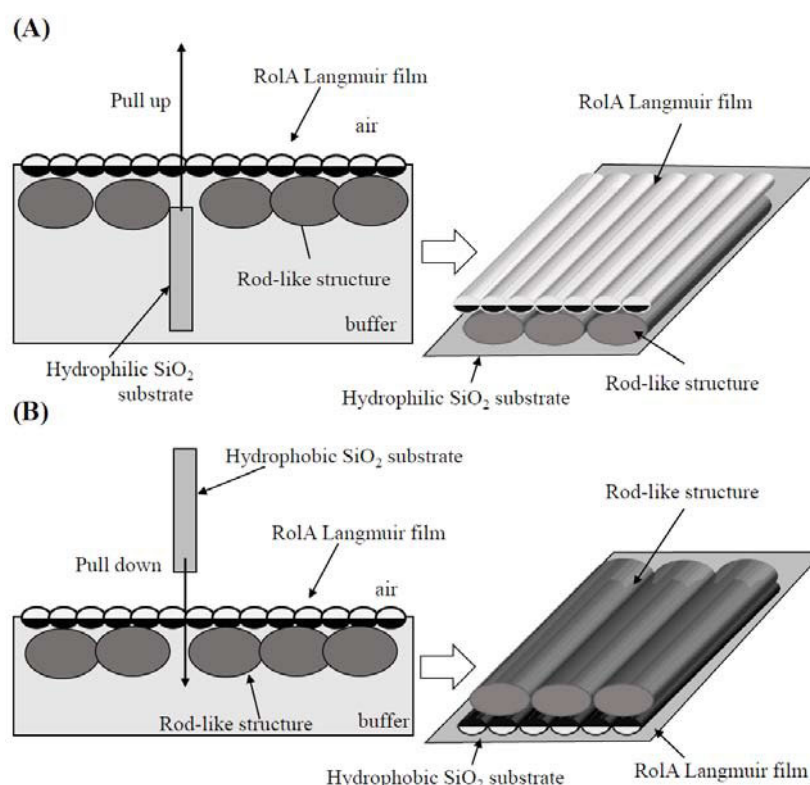


Fig 10. Schematic models of rodlet and rod-like structures in RolA Langmuir films formed by compression.

A RolA multilayer is transferred from the air–water interface onto the SiO_2 substrate. A dark gray large circle or cylinder is a rod-like structure. A small circle or cylinder which has a black part (hydrophilic part) and a light gray part (hydrophobic part) is a RolA Langmuir film. (A) RolA multilayer is transferred onto the hydrophilic SiO_2 substrate. Rod-like structures of RolA are exposed on the surface. (B) RolA multilayer is transferred onto the hydrophobic SiO_2 substrate. Rodlet is exposed on the surface.

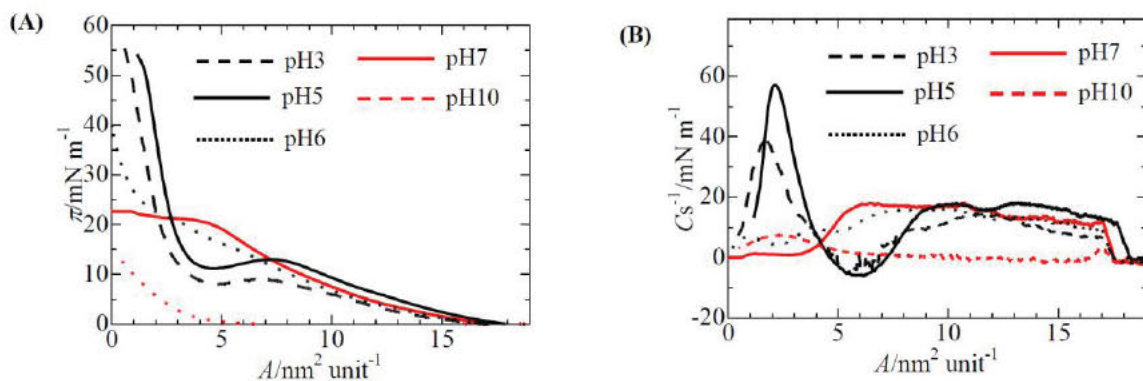


Fig 11. Isotherm profiles for RoIA Langmuir film at various pH.

Black dashed line : pH3. Black solid line : pH5. Black dotted line : pH6. Red solid line : pH7. Red dashed line : pH10. (A) Surface pressure (π)-area that a RoIA molecule occupies on the liquid surface (A) isotherm of RoIA at 20°C. (B) Compression moduli (C_s^{-1})- A isotherm of RoIA at 20°C. Compression moduli (C_s^{-1}) were calculated from the π - A isotherm.

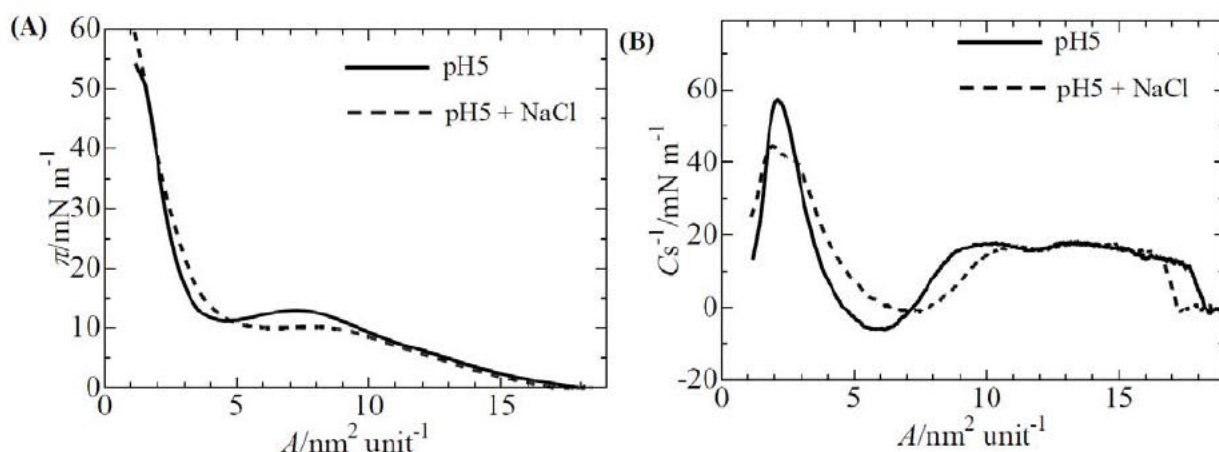


Fig 12. Isotherm profiles for RoIA Langmuir film at pH5 with/without NaCl.

Solid line : pH5 in the absence of NaCl. Dashed line : pH5 in the presence of 150 mM NaCl. (A) Surface pressure (π)-area that a RoIA molecule occupies on the liquid surface (A) isotherm of RoIA at 20°C. (B) Compression moduli (C_s^{-1})- A isotherm of RoIA at 20°C. Compression moduli (C_s^{-1}) were calculated from the π - A isotherm.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名	寺内 裕貴
審 査 委 員	主査：教授 阿部 敬悦 副査：准教授 新谷 尚弘 准教授 二井 勇人 教授 五味 勝也
学 位 論 文 題 目	麹菌由来界面活性タンパク質 hydrophobin RolA の自己組織化機構の解明
論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨	
<p>糸状菌はバイオポリマーを加水分解する酵素を多種類生産し、自然界において分解者として重要な役割を持つ。バイオポリマー等の固体高分子の酵素的加水分解は、病原性糸状菌の感染プロセスにも重要であり、また、その能力は古くから産業利用されてきた。糸状菌の新奇な固体高分子メカニズムを研究することで、生物学的知見の蓄積や、産業的应用が期待できる。産業糸状菌 <i>Aspergillus oryzae</i> (麹菌) より見出された、界面活性タンパク質 RolA とポリエステラーゼ間の分子間相互作用現象による固体高分子分解促進現象は、界面活性タンパク質が固体高分子表面に吸着、自己組織化構造を形成した後に、ポリエステラーゼをリクルートすることで生じる。候補者の研究は、固体高分子分解の初期段階に必要な界面活性タンパク質の界面への配向吸着および自己組織化メカニズムの解明に取り組んだものである。</p> <p>本研究において、候補者は以下の事項を明らかにした。</p> <p>(1) 界面活性タンパク質の固体表面への吸着メカニズムと自己組織化メカニズム</p> <p>水晶発振子マイクロバランス法 (QCM) による分子間相互作用解析より、麹菌界面活性タンパク質 RolA の固体表面への吸着は、固体表面の性質によらず、液中 pH が RolA 等電点に近いほど 固体表面への吸着量が多かったことから、RolA は固体表面に対し疎水的相互作用で吸着していることを明らかにした。原子間力顕微鏡 (AFM) 観察によって、RolA の自己組織化構造が RolA 濃度が高濃度になると形成されることを明らかにした。また、疎水性表面と荷電性表面で形成される自己組織化構造が異なったことから、RolA の自己組織化機構に RolA 中の荷電性アミノ酸残基が寄与する可能性が示唆された。</p> <p>(2) 界面活性タンパク質の気液界面での自己組織化メカニズム</p> <p>Langmuir 膜 (L 膜) 作製法によって、RolA が気液界面において 2 段階の相転移の後、自己組織化構造の膜を形成することを明らかにした。AFM 観察によって、親水性表面と疎水性表面に転写された RolA の自己組織化構造が異なったことから、RolA の L 膜が自己組織化構造の膜とミセルと考えられる膜が重なる、複層膜であることを明らかにした。また、RolA の自己組織化にはイオンの相互作用は働いておらず、水素結合や疎水的相互作用が重要であることが示唆された。</p> <p>以上、候補者の研究では、界面化学的解析法と生物化学的解析法を組み合わせることによって、界面活性タンパク質の吸着メカニズムと自己組織化構造形成メカニズムの考察に至った。これらは学術的にも、産業的にも有用な成果として考えられ、審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものとして認めた。</p>	